

機関番号：82111

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19380015

研究課題名（和文）ダイズ生育初期の湿害発生時におけるタンパク質群による制御機構解明

研究課題名（英文）Clarification of controlling mechanism by proteins in soybean under flooding stress

## 研究代表者

小松 節子（KOMATSU SETSUKO）

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究所大豆生理研究チーム・チーム長

研究者番号：90355751

研究成果の概要（和文）：ダイズの収量の不安定要因である湿害を解決するために、ダイズの生育初期における湿害発生機構を、プロテオーム解析技術を用いてタンパク質レベルから包括的に解析した。ダイズ出芽期の冠水ストレスにより、根端部分は顕著に傷害を受け、細胞壁、細胞膜、ミトコンドリア等に存在する多数のタンパク質群が変動した。特に、湿害によるリグニン化の抑制やエネルギー代謝効率の低下等の改善が重要であることを示唆した。

研究成果の概要（英文）：Flooding is a major problem for soybean because it reduces the growth and grain yield. To investigate the function of proteins in the response to flooding stress, proteome techniques have been used. Proteins in cell wall, plasma membrane and mitochondria were remarkably up- or down-regulated under flooding stress. Especially, it is suggested that the improvement of the decrease of the lignification and energy metabolism might be important.

## 交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2007年度 | 4,700,000  | 1,410,000 | 6,110,000  |
| 2008年度 | 3,800,000  | 1,140,000 | 4,940,000  |
| 2009年度 | 3,800,000  | 1,140,000 | 4,940,000  |
| 2010年度 | 2,600,000  | 780,000   | 3,380,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 14,900,000 | 4,470,000 | 19,370,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学 作物学・雑草学

キーワード：ダイズ、根系、湿害、ネットワーク、プロテオーム

## 1. 研究開始当初の背景

日本のダイズは大部分が水田転換畑で栽培されていることから、湿害の発生が大きな問題である。長雨や台風の多い日本においてはダイズの収穫量が不安定であり、輸入に頼っているのが現状で、国産ダイズの安定的多収が生産から実需・消費に至る各方面で望まれている。ダイズは耐湿性の低い作物であり、既存の品種・系統に画期的な耐湿性を有するものは知られていない。耐湿性ダイズ品種の選抜や作出、さらには遺伝子改良・新形質の導入による耐湿性の飛躍的な向上が生産安定化のために急務である。ダイズの生産性に

係わる重要形質である耐湿性の改良を目指し、ダイズの湿害を回避することは生産性の安定・向上に有用である。

日本の多くの地域で、ダイズの播種は梅雨期に重なっているため、特に発芽から出芽に至る生育初期の湿害が問題になっている。ダイズの生育初期の湿害は、種子吸水時と幼根が種皮を破って伸長を開始した後では発生機構が全く異なる。前者は種子含水率の調節により実用的に回避できるが、後者についてはその発生機構について研究した事例は未だ無い。植物の湿害は酸素欠乏や病害の発生によって起こり、植物の低酸素ストレス耐性

については、シロイヌナズナを中心に分子生理学的解析が行われ、嫌気代謝系が重要な役割を果たすことが推定されている。ダイズに共通した作用機構があるかどうかは不明であり、生育初期の湿害発生機構を包括的に解析し、未知の湿害発生機構の存在も視野に入れて解明する必要がある。

## 2. 研究の目的

ダイズ生育初期における湿害発生機構を、未知の湿害発生機構も視野に入れて、プロテオーム解析技術を用いてタンパク質レベルから包括的に解析し、タンパク質間相互作用解析により湿害発生ネットワークを明らかにする。そのために、ダイズの初期生育時において湿害発生により変動するタンパク質群を包括的に解析する。さらに、突然変異ダイズ等を用いて冠水抵抗性を指標として選抜し、プロテオーム解析で検出されたタンパク質あるいは遺伝子の発現を解析する。このことにより、ダイズの出芽期の湿害発生機構を明らかにする。本研究により、将来的にダイズの湿害を回避することにつながり、生産性の安定・向上に貢献する。

## 3. 研究の方法

(1) ダイズの出芽期の湿害時に変動するタンパク質群のデイファレンシャル解析

① 実験材料：ダイズ品種エンレイの種子を、スポンジや砂に播種2日後に冠水処理し、経時的に根数、主根長、側根および不定根、新鮮重を測定する。実際に形態に変動が確認される条件下で経時的に冠水処理した材料を実験に供する。

② 従来の二次元電気泳動法による変動するタンパク質群の解析：冠水処理後経時的に細胞質および膜画分タンパク質を超遠心分離法により分画し、トリクロロ酢酸・アセトンで濃縮し、二次元電気泳動法により分離する。次に、画像解析ソフトを用いて、二次元電気泳動パターン上のタンパク質の発現量を解析し、湿害時に変動するタンパク質群を同定する。

③ 微量タンパク質の解析：同時並行でダイズの微量タンパク質群の同定法を改良し利用する。微量な機能性タンパク質群の検索手法については、蛍光標識二次元電気泳動法やゲルフリープロテオミクス技術を利用する。

④ 変動するタンパク質群の構造解析：ダイズにおけるタンパク質の構造解析は、マイクロエドマンシーケンス法および質量分析計解析後のDeNovo解析法によりアミノ酸配列を着実に決定する。

(2) デイファレンシャル解析で同定された湿害時に変動するタンパク質群のネットワーク解析

① オルガネラプロテオミクス技術によるタンパク質間ネットワーク解析：湿害下で変動するタンパク質群の細胞内局在性を明らかにすることにより、タンパク質間相互作用を解析する。湿害下の出芽期ダイズから細胞壁、細胞膜、ミトコンドリア等を精製し、プロテオーム技術にて変動するタンパク質を解析する。

② タンパク質間相互作用解析ソフト利用によるネットワーク解析：包括的な手法としてタンパク質群の経時的発現解析後クラスター解析しS-System法を用いたタンパク質間ネットワーク解析法を行い、ダイズの耐湿性に関与する候補タンパク質群を絞り込む。絞り込まれた湿害に応答して変動する候補タンパク質群のアミノ酸配列を利用してプライマーを作成し、PCR法によりプローブを調整し定量リアルタイムPCR法にて、RNAレベルでの発現解析を行い、耐湿性との関連を確定する。

(3) ネットワーク解析で選出された耐湿性関連候補タンパク質の機能解明と遺伝子単離

① 完全長cDNAの単離：絞り込まれたタンパク質遺伝子について、得られたアミノ酸配列を利用してプライマーを調整し、PCR法を用いて遺伝子を単離する。

② 湿害時に変動するタンパク質・遺伝子の機能解明：ダイズの初期生育時の湿害に応答する候補タンパク質・遺伝子について、機能解明を行うために、*in situ*ハイブリダイゼーション法等によってタンパク質・遺伝子の組織内局在性を明らかにする。

(4) 耐湿性突然変異ダイズの選抜およびその利用による耐湿性関連候補遺伝子の評価

① 耐湿性突然変異ダイズの選抜：耐湿性品種は選抜されていない。そこで重イオンビーム・炭素イオンをダイズに照射し(理研との共同研究)突然変異ダイズを作出し、冠水抵抗性を指標として耐湿性ダイズを選抜する。

② 耐湿性突然変異ダイズの利用による耐湿性候補遺伝子の評価：上記で選抜された耐湿性突然変異ダイズを用いて、耐湿性候補遺伝子の発現を解析する。

## 4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

① 包括的手法としてプロテオーム解析技術を用いて、ダイズ出芽期の冠水ストレスで変動するタンパク質群を解析した。多くのタンパク質群が増加あるいは減少し、その中でも顕著に変動するアスコルビン酸ペルオキシダーゼは、冠水時にタンパク質および遺伝子レベルで減少することを明らかにした(図1)。

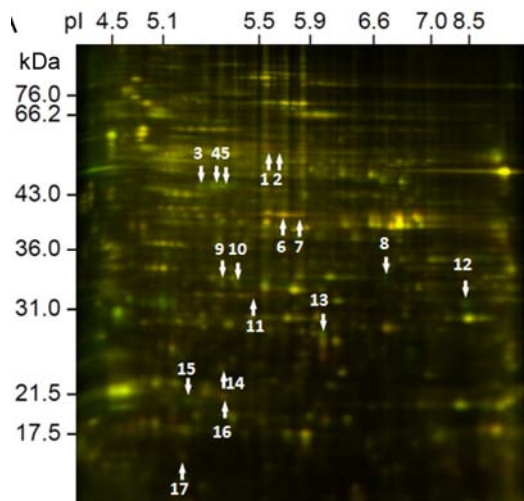


図1 蛍光標識二次元電気泳動による冠水ストレスで変動するダイズタンパク質群の検出：ダイズ出芽期において無処理と冠水処理群からタンパク質を抽出し、それぞれに蛍光色素で標識後二次元電気泳動でタンパク質を分離した、番号は冠水ストレスで変動するタンパク質を示す。

② アスコルビン酸ペルオキシダーゼをコムギの無細胞系を用いて発現させ抗体を調整し、経時的・器官特異的な発現を解析した結果、ダイズの出芽期に増加し、冠水ストレスで減少することを明らかにした。さらに、*in situ* ハイブリダイゼーション法により、ダイズの分裂の激しい組織で発現し、冠水ストレスで顕著に減少することを明らかにした (図2)。

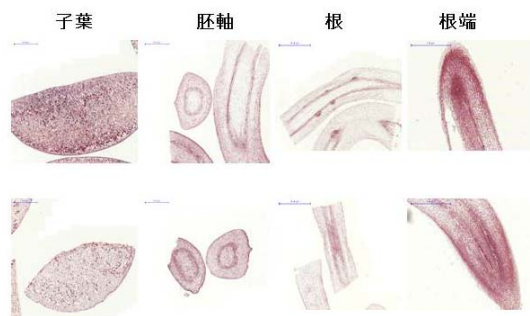


図2 *in situ* ハイブリダイゼーション法によるアスコルビン酸ペルオキシダーゼの局在：図上は無処理、下は冠水処理時の各器官を示す。

③ タンパク質の相互作用を検討するために、細胞膜および細胞壁に存在するタンパク質群を解析した。ダイズ出芽期の冠水ストレスにより、病害・防御反応、およびタンパク質合成およびタンパク質修復を、タンパク質リン酸化を介して制御していることを明らかにした。さらに、細胞壁においては、リグニン合成やリグニン化に関与するタンパク質群が、冠水ストレスにより顕著に抑制されていることを明らかにした (図3)。



図3 ダイズ根端部分のリグニン染色：図左は無処理、右は冠水処理の根端部分を示す。

④ 冠水条件下で変動するダイズミトコンドリアタンパク質のプロテオーム解析を行った結果、クエン酸回路および電子伝達系の複合体 I と II は活性化されるが、複合体 III、IV、V は阻害され ATP 産生を抑制することにより、エネルギー代謝効率を低下することを証明した。

⑤ ダイズには耐湿性品種は選抜されていないことより、重イオンビーム・炭素イオンをダイズに照射し (理研との共同研究) 突然変異ダイズを作成した。発芽試験および生長試験を行い、発芽率の影響を与えないが、その後の生長量を半減する照射量として 100Gy を選択し、種子を増殖して M3 種子を採取することにより、耐湿性研究の素材を開発した。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

ダイズの出芽期における冠水ストレスに関与するタンパク質群を明らかにし、その相互関係が明らかになりつつあり、その成果は学会報告と同時に論文として報告した。さらに、海外からの講演依頼を受け、招待講演を行った。

(3) 今後の展望

① 突然変異ダイズを用いて出芽期の冠水抵抗性を示すダイズを選抜し、機能解明実験に用いる。

② 湿害時に誘導されたタンパク質の抗体や遺伝子の DNA プローブを用いて、突然変異体中での発現量を解析する。

③ 冠水抵抗性突然変異ダイズを用いてプロテオーム解析を行うことにより、耐湿性機構に関与するタンパク質群を明らかにする。

④ 本課題で絞り込んだ耐湿性候補タンパク質・遺伝子の機能を考察し、湿害発生機構あるいは耐湿性機構を明らかにする。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

① Nanjo Y, Nouri MZ, Komatsu S. Quantitative

proteomic analyses of crop seedling subjected to stress conditions; a commentary. *Phytochemistry*, 72 (2011) 1263-1272. 査読有

- ② Nanjo Y, Skultny L, Ashraf Y, Komatsu S. Comparative proteomic analysis of early-stage soybean seedlings responses to flooding by using gel and gel-free techniques. *Journal of Proteome Research*, 9 (2010) 3989-4002. 査読有
- ③ Kong F, Oyanagi A, Komatsu S. Cell wall proteome of wheat roots under flooding stress using gel-based and LC MS/MS-based proteomics approaches. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1804 (2010) 124-136. 査読有
- ④ Komatsu S, Kobayashi Y, Nishizawa K, Nanjo Y, Furukawa K, Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in soybean cell wall during flooding stress. *Amino Acids*, 39 (2010) 1435-1449. 査読有
- ⑤ Komatsu S, Wada T, Abelea Y, Nouri Z, Nanjo Y, Nakayama N, Shimamura S, Yamamoto R, Nakamura T, Furukawa K, Analysis of plasma membrane proteome in soybean and application to flooding stress response. *Journal of Proteome Research*, 8 (2009) 4487-4499. 査読有
- ⑥ Shi F, Yamamoto R, Shimamura S, Hiraga S, Nakayama N, Nakamura T, Yukawa K, Hachinohe M, Matsumoto H, Komatsu S. Cytosolic ascorbate peroxidase 2 (cAPX) is involved in the soybean response to flooding. *Phytochemistry*, 69 (2008) 1295-1303. 査読有

[学会発表] (計7件)

- ① Komatsu S. Soybean Proteome Database: its application to analysis of proteins under flooding stress. The 3rd National Plant Proteomics Conference of China, 2010.5.24. Wuhan
- ② 山本明史、西澤けいと、南條洋平、古川清、小松節子、出芽期のダイズ冠水ストレスにより変動するミトコンドリアタンパク質のプロテオーム解析、第33回日本分子生物学会年会、2010.12.7. 神戸
- ③ 小林之人、西澤けいと、南條洋平、島村聡、中村卓司、古川清、小松節子、冠水処理により変動するダイズ細胞壁タンパク質群の解析、第32回日本分子生物学会年会、2009.12.10. 横浜
- ④ Yukawa K, Komatsu S, Identification of ascorbate peroxidase 2 in soybean root under flooding stress. International Symposium of Plant Proteome Research: Contribution of Proteomics Technology in Creation of Useful

Plants. 2008.3.10-11. Tsukuba

- ⑤ 和田拓也、NOURI Zaman、古川清、小松節子、ダイズ細胞膜のプロテオーム解析、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会・合同大会、2008.12.12. 神戸
- ⑥ NOURI Zaman、小松節子、Identification of osmotic stress related proteins in soybean plasma membrane. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会・合同大会、2008.12.12. 神戸
- ⑦ Shi F, Yamamoto R, Shimamura S, Hiraga S, Nakamura N, Nakamura T, Yukawa K, Hachinohe M, Matsumoto H, Komatsu S. Ascorbate peroxidase 2 (cAPX) is involved in the soybean response to flooding. 9th Conference of the International Society for Plant Anaerobiosis. 2007.11.18-23, Sendai

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小松 節子 (KOMATSU SETSUKO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究所大豆生理研究チーム・チーム長

研究者番号：90355751

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者